

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15701

研究課題名(和文) アストロサイト特異的かつ依存的なてんかん原生獲得機構の解明

研究課題名(英文) Reactive astrocyte-driven epileptogenesis

研究代表者

佐野 史和 (Sano, Fumikzu)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00622375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、側頭葉てんかんモデルマウスを用いて、アストロサイト特異的かつ依存的なてんかん原生獲得機構について検討を行った。まず、モデルマウスの海馬アストロサイトからmRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行うことで、てんかん原生型アストロサイトの分子プロファイルを網羅的に解析した。その結果、ある受容体(X受容体とする)の発現亢進がてんかん原生型アストロサイトの本質的な機能変調の原因の一つとなっている可能性を見出した。(てんかん性アストロサイトではCa<sup>2+</sup>興奮性が亢進していたが、これがX受容体の阻害剤で軽減した。)

研究成果の学術的意義や社会的意義

けいれん重積発作後に、「グリア細胞」の一種であるアストロサイトが「てんかん原生型アストロサイト」に変化することで、難治てんかんである側頭葉てんかんの発症に関与することを明らかにした。難治てんかんを引き起こす異常なアストロサイト「てんかん原生型アストロサイト」の特徴が明らかとなったことで、これまでの神経細胞を標的とした抗てんかん薬とは全く異なる、新しい抗てんかん薬の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Extensive activation of glial cells is documented in various central nervous system disorders including epilepsy following status epilepticus (SE). Recent evidence suggests that such activation may represent a cause of subsequent epileptogenesis. Overall, we clearly demonstrate that activation of glial cells in the hippocampus is a cause of epileptogenesis, for which distinct glial cells are activated in a sequential manner; i.e., initial and transient microglial activation with concomitant pro-inflammatory cytokine production induces the appearance of subsequent and lasting astrocytic activation characterized by enhanced IP3R2-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling. These activated astrocytes eventually enhance seizure susceptibility. Thus, our findings suggest that the therapeutic target to prevent epilepsy after SE should be shifted from microglia (early phase) to astrocytes (late phase).

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは、200人に1人が罹患する可能性がある頻度が高い神経疾患である。さらにその30%前後は従来の抗てんかん薬が無効な難治てんかんであり、その治療及び予防に関する社会的要請は非常に大きい。現在てんかん治療に用いられている薬剤は、主に神経細胞に作用する抗「けいれん」薬であり、発作抑制(神経細胞の興奮の抑制)には有効であるが、けいれん発作の原因であるてんかん原生に対する作用は極めて乏しいのが実情である。

てんかん発作とは、脳の過剰に同期した神経活動に起因する一過性の徴候・症状の発現であると定義されているが、まずそもそもの「なぜ神経細胞が『過剰に同期』して活動するのか」というてんかん原生獲得の本質に関する問いへの理解が進んでいないのが現状である。しかし近年、グリア細胞の一種であるアストロサイトが、多数のシナプスを取り囲み(約10万シナプス/1アストロサイト)、グリア伝達物質放出を介して神経細胞の活動およびシナプス伝達をダイナミックに制御していることが報告された。そこで、てんかん原生領域に認められるアストロサイトの増生が、従来解釈されていた様な単なるてんかん発作の結果ではなく、神経細胞の過剰に同期した活動というてんかん病態の本質に積極的な役割を担っている可能性が示唆されるが、その機序は未解明の点が多い。申請者はこれまでに、ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスを用いた研究により、アストロサイトの異常活性化(形態変化・Caシグナルの変化)とてんかん原生獲得の時空間過程が強く相関していることを明らかとし、これがてんかん原生獲得のトリガーとなっている可能性を見出している。この様な背景のもと、本研究では、申請者の見出したてんかん病態時の異常活性化アストロサイト(以下、「てんかん原性型アストロサイト」)の機能異常と神経細胞の過剰同期興奮(てんかん発作)との因果関係を明らかにし、「アストロサイト機能異常に依存したてんかん原生獲得機序」の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

現在てんかん治療に用いられている薬剤は、主に神経細胞のイオンチャンネルに作用してその興奮性を抑制するが、てんかん原生に対する作用は極めて乏しいのが実情である。本研究は、アストロサイトの機能変調が、局所的な神経細胞の過剰同期興奮を引き起こすとの作業仮説のもと、てんかん原性型アストロサイト(てんかん病態時の活性化アストロサイト)の異常活動と神経細胞の過剰同期興奮(てんかん発作)との因果関係を分子レベルで明らかにすることを最大の目的としている。つまり、「てんかん原生の分子病態をてんかん原性型アストロサイトの視点から明らかにする」ものである。さらに、このてんかん原性型アストロサイトの機能変調をトランスクリプトーム解析により網羅的に解析し、in vivo および ex vivo での機能解析を追加検討することで、アストロサイトを標的とした新規抗てんかん薬の候補を探索していく。

## 3. 研究の方法

### 1) RNA-seq によるてんかん原性型アストロサイトのトランスクリプトーム解析

磁気細胞分離法を用いて海馬からアストロサイトを分離し RNA が抽出可能であることを確認している。側頭葉てんかんモデルマウスのアストロサイトから mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、てんかん原性型アストロサイトの分子プロファイルを網羅的に解析する。

### 2) てんかん原性型アストロサイトの発現変動遺伝子の機能解析

1) からアストロサイト性のてんかん関連候補分子を抽出し、それらの薬理学・分子生物学的操作が、アストロサイトの Ca<sup>2+</sup>興奮性及び神経活動に与える影響を、海馬急性スライス標本(ex vivo)を用いて解析する。具体的には、Glast-creERT2::flxGCaMP3 マウスを用いて活性化アストロサイトの Caシグナルの異常および神経細胞の易興奮性を、Ca<sup>2+</sup>イメージング法(アストロサイトの活動の指標)と電気生理学的手法(神経細胞の活動の指標)を用いて同時に評価する。

### 3) てんかん原性型アストロサイト制御による、てんかん治療可能性の検討

1), 2) から得られた候補遺伝子に関連する作動薬・拮抗薬が抗てんかん作用を有するか、側頭葉てんかんモデルマウス(in vivo)を用いて解析する。具体的にはてんかん原生獲得期のマウスに候補薬剤を投与することで、けいれん易誘発性が抑制されるかについて、行動観察および発作時脳波解析を行い評価する。

## 4. 研究成果

### 1) RNA-seq によるてんかん原性型アストロサイトの表現型解析

野生型マウスにおいては SE により、438 遺伝子発現が亢進し、150 遺伝子の発現が低下した。しかし、IP3R2KO では SE により 105 遺伝子の発現が亢進し、324 遺伝子で発現が低下した。さらに SE により野生型マウスで発現亢進し、かつ、IP3R2KO では変化しない分子、つまりてんかん原性型アストロサイトの実行分子候補として、50 の遺伝子を抽出し、その中にシナプス新生関連遺伝子としてしられ X 受容体(論文投稿中のため、受容体名は特定していない)を見いだした。

### 3) アストロサイト X 受容体依存的なてんかん原生獲得機構の解明

まず、蛍光免疫組織化学染色法を用いて、野生型マウスにおいてはアストロサイトにおける X 受容体の発現は生後 21 日目にほぼ消失する一方で、てんかん原性を獲得した野生型マウスの成獣では（つまりてんかん原性型アストロサイトでは）X 受容体が再発現することを確認した。次に、アストロサイト特異的 X 受容体ノックアウトマウスでは、けいれん閾値の低下が認められないことを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fumikazu Sano, Eiji Shigetomi, Youichi Shinozaki, Haruka Tsuzukiyama, Kozo Saito, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroshi Horiuchi, Dennis Lawrence Cheung, Junichi Nabekura, Kanji Sugita, Masao Aihara, and Schuichi Koizumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI insight	6. 最初と最後の頁 e135391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.135391.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shigetomi E, Saito K, Sano F, Koizumi S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Aberrant calcium signals in reactive astrocytes: a key mediator in neurological disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fumikazu Sano, Eiji Shigetomi, Schuichi Koizumi, Takeshi Inukai, Masao Aihara
2. 発表標題 The mGluR5 signaling in reactive astrocytes promotes mossy fiber sprouting for epileptogenesis
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野史和、繁富英治、小泉修一、金村英秋、御子柴克彦、相原正男
2. 発表標題 Identification of epileptogenic astrocyte mediated by astrocytic Ca <sup>2+</sup> signals via IP3 receptor type2
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野史和、繁富英治、小泉修一、金村英秋、相原正男
2. 発表標題 けいれん重積後の神経炎症が神経回路に及ぼす影響：てんかん原生型アストロサイトの網羅的遺伝子発現解析から
3. 学会等名 第24回認知神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野史和、繁富英治、小泉修一、金村英秋、犬飼岳史、相原正男
2. 発表標題 Reactive astrocytes lead to mossy fiber sprouting for epileptogenesis following status epilepticus
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野史和、繁富英治、小泉修一
2. 発表標題 Epileptogenic astrocytes induced by initial activation of microglia following status epilepticus
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野史和
2. 発表標題 Contribution of activated glial cells in epileptogenesis after status epilepticus
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野史和
2. 発表標題 Astrogliosis by status epilepticus is dependent on IP3 receptor type2
3. 学会等名 第52回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野史和
2. 発表標題 Microglial VNUT derived ATP mediates astrogliosis-dependent epileptogenesis after status epilepticus
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野史和
2. 発表標題 Astrocytic Ca2+ signals via IP3 receptor type2 mediate reactive astrocytes after status epilepticus
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>山梨大学医学部小児科学教室  <a href="https://yuhp-ped.jp/">https://yuhp-ped.jp/</a>          山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学教室  <a href="https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html">https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html</a>          山梨大学医学部小児科学教室  <a href="https://yuhp-ped.jp/">https://yuhp-ped.jp/</a>          山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学教室  <a href="https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html">https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html</a>          薬理学講座 - 山梨大学医学部  <a href="https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html">https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html</a></p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------